

氏 名	稲 葉 洋 芳
学位(専攻分野の名称)	博 士 (バイオサイエンス)
学 位 記 番 号	甲 第 708 号
学 位 授 与 の 日 付	平成 28 年 3 月 20 日
学 位 論 文 題 目	恐怖記憶制御に対するタンパク質翻訳後修飾の役割の解析
論 文 審 査 委 員	主査 教 授・博 士 (農 学) 喜 田 聡 教 授・農 学 博 士 河 野 友 宏 准教授・博 士 (農 学) 小 川 英 彦 博士(医学), 博士(農学) 小 林 和 人*

## 論文内容の要旨

恐怖体験の記憶, すなわち, 恐怖記憶の実体は, 恐怖条件づけ記憶であり, 五感で感じた情報を条件刺激, 一方, 恐怖を非条件刺激とする関連づけ記憶と言える。恐怖記憶は条件づけ直後には不安定な短期記憶であるものの, 遺伝子発現を必要とする固定化のプロセスを経て, 安定化され長期記憶として貯蔵される。固定化された恐怖記憶は想起されると, 再び不安定な状態に戻り, 固定化と同様に遺伝子発現を必要とする再固定化のプロセスを経ることで, 安定な記憶として維持あるいは強化される。一方, 恐怖記憶は持続的に想起されると, 恐怖反応の表出を抑制する消去が誘導される。げっ歯類における恐怖条件づけ文脈記憶課題では, 文脈(場所)を条件刺激, 恐怖(電気ショック)を非条件刺激として両者の関連づけを記憶させる。具体的には, 電線を敷いた小箱(チャンバー; 文脈)にマウスを入れ, 軽い電気ショックを与えることで, 文脈に対する恐怖記憶を形成させる(トレーニング)。恐怖記憶は, 電気ショックチャンバーに再び戻した際にマウスが示す恐怖(すくみ)反応を測定して評価する(テスト)。所属研究室では, 恐怖記憶形成後, チャンバーにマウスを短時間(3分間)戻した場合には再固定化が誘導されるのに対して, 長時間(30分間)戻した場合には消去が誘導されることを明らかにした。さらに, 固定化, 再固定化と消去の分子機構の解析が進められ, 固定化と再固定化には海馬と扁桃体における遺伝子発現が要求されるのに対し, 消去記憶の維持(固定化)には前頭前野における遺伝子発現が要求されることを示してきた。

タンパク質翻訳後修飾は遺伝子発現制御における最終反応としてタンパク質の機能決定を行う重要な機構であり, 記憶制御に対する翻訳後修飾の機能的役割が注目されている。本研究では, 翻訳後修飾の中で, エピジェネ

ティクス制御を担うことが明らかにされているポリ ADP リボシル化, さらに, 広範なタンパク質にその修飾が観察される N-結合型糖鎖修飾に着目し, 恐怖記憶制御に対するこれらタンパク質翻訳後修飾の役割を行動薬理学的手法を用いて解析した。

### 1. 恐怖記憶制御に対するポリ ADP リボシル化の役割

ポリ ADP リボシル化は真核生物にのみ存在する可逆的な翻訳後修飾であり, 転写調節や DNA 修復など核内における生命現象の多くに機能的役割を示す。ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ 1 (poly(ADP-ribose) polymerase-1; PARP-1) はポリ ADP リボシル化を触媒する主要な酵素である。近年の研究から, PARP-1 活性化を介したヒストンのポリ ADP リボシル化が長期記憶形成に要求されることが示唆されているが, 想起後の恐怖記憶制御プロセスに対するポリ ADP リボシル化の役割は不明である。そこで, 恐怖記憶制御に対するポリ ADP リボシル化の役割を明らかにするために, 薬理学的手法を用いて, 恐怖条件づけ文脈記憶の固定化, 再固定化及び消去に対する PARP-1 の役割を解析した。

#### 1-1. 恐怖記憶固定化に対する PARP-1 の役割の解析

脳内微量注入法を用いて, 恐怖条件づけ文脈記憶固定化に対する海馬 PARP-1 活性化の役割を解析した。恐怖文脈条件づけ(トレーニング)の 5 分前に, PARP-1 阻害剤 3-アミノベンズアミド (3AB) を海馬に注入し, その 2 時間(短期記憶)または 24 時間(長期記憶)後に恐怖反応を示す時間の長さを測定した(テスト)。その結果, 2 時間後のテストでは 3AB 群は溶媒群と同程度の恐怖反応を示したのに対し, 24 時間後のテストでは 3AB 群は溶媒群と比較して有意に低い恐怖反応を示した。従って, 海馬の PARP-1 の阻害は短期記憶には

\* 福島県立医科大学 教授

影響を与えないものの、長期記憶形成を阻害することが示唆された。また、PARP-1 阻害剤 PJ34 をトレーニングの 5 分前に海馬に注入した場合でも、同様に長期記憶形成の阻害が観察された。対照的に、トレーニング直後に海馬に 3AB を注入した場合、前頭前野に 3AB を注入した場合には、長期記憶形成の阻害は観察されなかった。以上の結果から、固定化プロセスの早い段階、すなわちトレーニング時あるいは直後における海馬の PARP-1 活性化が恐怖条件づけ文脈記憶の固定化に必須であることが示唆された。

#### 1-2. 恐怖記憶再固定化に対する PARP-1 の役割の解析

恐怖条件づけ文脈記憶の再固定化に対する海馬の PARP-1 活性化の役割を解析した。トレーニングの 24 時間後に電気ショックチャンバーにマウスを 3 分間戻し（再エクスポージャー）、その 2 時間あるいは 24 時間後に再度チャンバーにマウスを戻して恐怖反応を測定した（テスト）。再エクスポージャーの 5 分前もしくは直後に、3AB を海馬に注入した。その結果、再エクスポージャーの 2 時間後では 3AB を注入された群は溶媒群と同程度の恐怖反応を示したのに対し、24 時間後では脳内注入のタイミングには依存せずに、3AB 群は溶媒群と比較して有意に低い恐怖反応を示した。従って、海馬の PARP-1 の阻害は想起 2 時間後には恐怖記憶に影響を与えないものの、想起 24 時間後には恐怖記憶を破壊することが示され、再固定化を阻害することが示唆された。また、PJ34 を海馬に注入した場合でも同様に、想起後の再固定化の阻害が観察された。一方、トレーニングの 24 時間後に再エクスポージャーを行わずに 3AB を海馬に注入した場合には恐怖反応の低下が見られなかったことから、海馬 PARP-1 の阻害は恐怖記憶の維持には影響を与えないことが示唆された。さらに、前頭前野に 3AB を注入した場合には、想起後の再固定化の阻害は観察されなかった。以上の結果から、海馬 PARP-1 の活性化が恐怖条件づけ文脈記憶の再固定化に必須であることが明らかとなった、さらに、恐怖記憶固定化の場合と異なり、再エクスポージャー直後の PARP-1 阻害でも記憶の破壊が観察されたことから、PARP-1 活性化が起るタイムポイントが固定化と再固定化では異なることが示唆された。

#### 1-3. 恐怖記憶消去に対する PARP-1 の役割の解析

恐怖条件づけ文脈記憶の消去に対する前頭前野における PARP-1 活性化の役割を解析した。1-2 と同様のタイムスケジュールでマウスを恐怖条件づけ文脈記憶課題に供したが、再エクスポージャーでは電気ショックチャン

バーにマウスを 30 分間戻した。再エクスポージャーの 5 分前もしくは直後に、3AB を前頭前野に注入した。その結果、再エクスポージャーの過程において 3AB と溶媒の両群共に、恐怖反応の低下を示した。この 24 時間後のテストでは溶媒群は依然として低い恐怖反応を示したのに対して、3AB 群は溶媒群と比較して有意に高い恐怖反応を示した。従って、前頭前野 PARP-1 の阻害は消去の獲得には影響を与えなかったものの、消去の維持を阻害することが示唆された。また、前頭前野に PJ34 を注入した場合でも同様に、消去の維持の阻害が観察された。一方、海馬に 3AB を注入した場合には、消去の維持に影響は観察されなかった。以上の結果から、前頭前野 PARP-1 活性化が恐怖条件づけ文脈記憶の消去の維持に必須であることが示された。

#### 1-4. 恐怖記憶固定化、再固定化及び消去時に誘導される遺伝子発現に対する PARP-1 活性化の役割の解析

上述したように、恐怖条件づけ文脈記憶の固定化、再固定化及び消去は新規遺伝子発現を必要とすることから、PARP-1 の活性化はこれら記憶制御プロセス群に必要な遺伝子発現活性化に寄与する可能性が考えられた。この可能性を検証するために、恐怖記憶制御時に認められる初期応答遺伝子 c-fos の発現誘導に対する PARP-1 活性化の役割を免疫組織染色法により解析した。

固定化時の c-fos 発現に対する PARP-1 活性化の役割を解析するために、血液脳関門に透過性を示す PARP-1 阻害剤 Tiq-A またはその溶媒をトレーニングの 30 分前に腹腔内投与し、トレーニング 90 分後の c-fos 発現誘導を解析した（電気ショック/溶媒群、電気ショック/Tiq-A 群）。対照群として、トレーニング時に電気ショックを受けなかった溶媒投与群と Tiq-A 投与群を設け（非ショック/溶媒群、非ショック/Tiq-A 群）、計 4 群の海馬における c-fos 陽性細胞数を測定した。その結果、電気ショック/溶媒群では他の 3 群に比較して海馬 c-fos 陽性細胞数は有意に多かったのに対し、電気ショック/Tiq-A 群では非ショック/溶媒群及び非ショック/Tiq-A 群と同程度であった。従って、PARP-1 活性の阻害によって恐怖記憶固定化時に誘導される海馬 c-fos 発現誘導が妨げられることが示された。

再固定化時の c-fos 発現に対する PARP-1 活性化の役割を解析した。トレーニング 24 時間後の 3 分間の再エクスポージャーの 90 分後に海馬における c-fos 発現を同様に解析した。再エクスポージャー 30 分前に Tiq-A を腹腔内投与し、固定化実験と同様の計 4 群を設けた。その結果、固定化と同様に、c-fos 陽性細胞数は電気ショック/溶媒群で有意に多かったのに対し、電気ショッ

ク/Tiq-A 群では非ショック両群と同程度であった。従って、PARP-1 活性の阻害によって恐怖記憶再固定化時の海馬における c-fos 発現誘導が妨げられることが示された。

消去時の c-fos 発現に対する PARP-1 活性化の役割を、再エクスポージャーの長さを 30 分間に延長した以外は、再固定化と同様に解析した。その結果、前頭前野における c-fos 陽性細胞数は電気ショック/溶媒群で有意に多かったのに対し、電気ショック/Tiq-A 群では非ショック両群と同程度であった。従って、PARP-1 活性の阻害によって恐怖記憶消去時の前頭前野における c-fos 発現誘導が妨げられることが示唆された。

以上の結果より、PARP-1 活性化は固定化、再固定化及び消去時に誘導される新規遺伝子発現誘導に寄与することが示唆された。

#### 1-5. 結論及び考察

海馬 PARP-1 活性化が恐怖条件づけ文脈記憶の固定化と再固定に必要であること、一方、前頭前野 PARP-1 活性化が消去の維持に必要であることが示唆された。従って、PARP-1 活性化を介したポリ ADP リボシル化が固定化に加え、想起後の恐怖記憶制御にも必要とされることが初めて明らかとなった。

## 2. 恐怖記憶制御に対する N-結合型糖鎖修飾の役割

タンパク質糖鎖修飾は遺伝子発現の最終段階の翻訳後修飾であり、真核生物において発現するタンパク質の過半数が糖鎖修飾を受けており、この糖鎖修飾はタンパク質の機能決定に重要な役割を担うことが知られている。糖鎖修飾は、N-結合型と O-結合型に大別される。小胞体においてアスパラギン残基の側鎖に付加された N-結合型糖鎖は小胞体やゴルジ体に存在する多種の酵素によるプロセッシングを受けて様々な形態に修飾される。現在までに、N-結合型糖鎖修飾は記憶関連タンパク質群においても生じることが明らかにされているが、恐怖記憶固定化、さらには、再固定化に必要とされるかは未だ不明である。そこで、N-結合型糖鎖修飾の過程で異なる反応を触媒する 3 種の酵素群の阻害剤をそれぞれ用いて、恐怖条件づけ文脈記憶固定化と再固定化に対する海馬における N-結合型糖鎖修飾の役割を検討した。

### 2-1. 恐怖記憶固定化に対する海馬 N-結合型糖鎖修飾酵素群の役割の解析

脳内微量注入法を用いて、恐怖条件づけ文脈記憶の固定化に対する海馬における N-結合型糖鎖修飾の役割を解析した。N-結合型糖鎖修飾の最初のステップである N-アセチルグルコサミン-1-リン酸トランスフェラーゼ

による N-結合型糖鎖付加の固定化に対する役割を解析するため、この酵素の阻害剤であるツニカマイシン (TM) をトレーニング直後に海馬に注入し、その 2 時間または 24 時間後に恐怖記憶を評価した。2 時間後のテストでは TM 群は溶媒群と同程度の恐怖反応を示したのに対し、24 時間後のテストでは TM 群は溶媒群と比較して有意に低い恐怖反応を示した。従って、海馬における N-結合型糖鎖付加の阻害は短期記憶には影響を与えないものの、長期記憶形成を阻害すること、すなわち固定化を阻害することが示された。

次に、N-結合型糖鎖修飾経路の中流あるいは下流に位置する小胞体及びゴルジ体における N-結合型糖鎖プロセッシングの阻害の影響を解析した。小胞体における N-結合型糖鎖プロセッシングを阻害する  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤 1-デオキシノジリマイシン (DNJ)、あるいは、ゴルジ体における N-結合型糖鎖プロセッシングを阻害するゴルジ  $\alpha$ -マンノシダーゼ II 阻害剤スワインソニン (SW) を用いて、同様の解析を行った。その結果、上述の結果と同様に、海馬の小胞体あるいはゴルジ体における N-結合型糖鎖プロセッシングの阻害は恐怖記憶固定化を阻害することが示された。

以上の N-結合型糖鎖修飾経路に存在する 3 種類の酵素群に対する阻害剤を用いた解析結果から、海馬における N-結合型糖鎖修飾が恐怖条件づけ文脈記憶の固定化に必須であることが示唆された。

### 2-2. 恐怖記憶再固定化に対する海馬 N-結合型糖鎖修飾酵素群の役割の解析

恐怖条件づけ文脈記憶の再固定化に対する海馬における N-結合型糖鎖修飾の役割を解析した。トレーニング 24 時間後の 3 分間の再エクスポージャーの直後に、N-結合型糖鎖修飾酵素阻害剤 (TM, DNJ あるいは SW) を海馬に注入し、その 2 時間または 24 時間後にテストを行った。その結果、2 時間後のテストでは阻害剤群は溶媒群と同程度の恐怖反応を示したのに対し、24 時間後のテストでは阻害剤群は溶媒群と比較して有意に低い恐怖反応を示した。従って、固定化の結果と同様に、海馬における N-結合型糖鎖修飾の阻害は想起 2 時間後には恐怖記憶に影響を与えないものの、想起 24 時間後には恐怖記憶を破壊することが示された。一方、トレーニングの 24 時間後に再エクスポージャーを行わずに阻害剤を海馬に注入した場合には恐怖反応の低下が見られなかったことから、海馬における N-結合型糖鎖修飾の阻害は恐怖記憶の維持には影響を与えないことが示唆された。以上の結果から、海馬における N-結合型糖鎖修飾が恐怖条件づけ文脈記憶の再固定化に必須であることが



示唆された。

### 2-3. 結論及び考察

海馬における N-結合型糖鎖修飾が恐怖条件づけ文脈記憶の固定化及び再固定化に要求されることが示唆され、恐怖記憶制御に対する N-結合型糖鎖修飾の重要性が初めて示唆された。今後、N-結合型糖鎖修飾による恐怖記憶制御の分子機構を詳細に解析する必要があると考えられた。

## 3. 総括

本研究の成果により、恐怖記憶制御に対するタンパク

質翻訳後修飾の重要性が明らかになった。今後、記憶制御過程におけるタンパク質翻訳後修飾の作用点、さらには、標的タンパク質を同定することで、記憶制御の分子機構の解明が進むことが期待される。また、本論文では海馬及び前頭前野の役割にフォーカスして解析を進めたが、今後、扁桃体を代表とする他領域におけるタンパク質翻訳後修飾の役割の解析も必要である。今後、タンパク質翻訳後修飾による恐怖記憶制御機構の全貌が解明され、心的外傷後ストレス障害などの恐怖記憶制御の破綻を原因とする疾患の治療法開発に繋がることを期待したい。

## 審査報告概要

恐怖記憶では、固定化、再固定化、消去の記憶制御プロセス群において脳領域特異的な新規遺伝子発現が必要である。一方、タンパク質翻訳後修飾は遺伝子発現制御における最終反応としてタンパク質の機能決定を行う重要な反応である。そこで本論文では、ポリ ADP リボシル化と広範なタンパク質にその修飾が観察される N-結合型糖鎖修飾を中心に、恐怖記憶制御に対するタンパク質翻訳後修飾の役割をマウス行動薬理学的手法を用いて解析した。ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ 1 (PARP-1) の阻害剤を各脳領域に微量注入した結果、恐怖記憶固定化、再固定化と消去には、脳領域特異的な PARP-1 によるポリ ADP リボシル化が必要されることが強く示唆された。一方、同様の方法を用いた解析から、海馬における N-結合型糖鎖修飾酵素群の阻害によ

り恐怖記憶固定化と再固定化が妨げられ、固定化と再固定化に海馬における N-結合型糖鎖修飾が必要とされることが強く示唆された。以上の本論文における研究成果により、恐怖記憶制御に対するタンパク質翻訳後修飾機構の重要性が明らかになった。

主査および副査から審査報告がなされ、専攻内可否を審議した。その結果、学位請求者の経歴や学術業績が学位記申請の要項を満たしていること、外国語を含む最終試験に合格していること、学位請求論文の研究内容や発表会での質疑応答の内容が十分であることが認められた。

よって、審査員一同は博士（バイオサイエンス）の学位を授与する価値があると判断した。